

PATENT ABSTRACTS OF JAPAN

(11)Publication number : 06-090798
(43)Date of publication of application : 05.04.1994

(51)Int.CI. C12Q 1/68
//C12Q 1/68
C12R 1:445)

(21)Application number : 04-054232 (71)Applicant : TOAGOSEI CHEM IND CO LTD
(22)Date of filing : 05.02.1992 (72)Inventor : HAYASHI TAKAKO
YOSHIDA MASAO
TERADA KENJI

(54) PROBE FOR DETECTING STAPHYLOCOCCUS AUREUS AND METHOD FOR DETECTING THE SAME

(57)Abstract:

PURPOSE: To conduct the detection quickly and accurately in clinical examinations, esp. those involving food poisoning or food examinations.

CONSTITUTION: The objective probe consisting of a probe for a DNA or RNA nucleic acid having a specific sequence. The second objective method for detecting Staphylococcus aureus using this probe. With this probe, Staphylococcus aureus can be detected quickly and accurately; besides, there is no need for any medium for specimen transport.

LEGAL STATUS

[Date of request for examination]

[Date of sending the examiner's decision of rejection]

[Kind of final disposal of application other than the examiner's decision of rejection or application converted registration]

[Date of final disposal for application]

[Patent number]

[Date of registration]

[Number of appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of requesting appeal against examiner's decision of rejection]

[Date of extinction of right]

Copyright (C); 1998,2003 Japan Patent Office

*** NOTICES ***

JPO and NCIPPI are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

CLAIMS

[Claim(s)]

[Claim 1] The probe for Staphylococcus-aurei (Staphylococcus aureus) detection characterized by being DNA or the RNA nucleic acid probe which has the array of the following ** thru/or **, or its complementary sequence.

10 20 30 40 50** XGAGXAACAC GXGGAXAACC XACCXAXAAG ACXGGGAXAA
CXXCGGGAAA 60 70 80 90 100 CCGGAGCXAA XACCGGAXAA XAXXXXGAAC CGCAXGGXXC
AAAAGXGAAA 110 120 130 140 150 GACGGXCXXG CXGXCACXXA XAGAXGGGAX
CCGCGCXGCA XXAGCXAGXX GGXA 1020 3040 50** GAGXAACACG XGGAXAACX
ACCXAXAAGA CXGGGAXAAC XXCGGGAAAC 60 70 80 90 100 CGGAGCXAAAC ACCGGAXAACX
AXXXXGAACC GCAXGGXXCA AAAGXGAAAG 110 120 130 140 CAGGXCCXXCG
XGXCACXXAX AGAXGGAXCC CGCGXCGAXX AGC 10 20 30 40 50** GGXCXXCGGA
XCGXAAAACX CXGXXAXXAG GGAAGAACAX AXGXGXAAAG 60 70 80 AACXGXGCAC
AXCXXGACGGXACXXAAXCA GAAAGC 10 20 30 40 50** AXGGAGGAAC ACCAGXGGCG
AAGGGCACXX XCXGGXCXGX AACXGACGX 10 20 30 40 ** AGXGXAXAGG GGXXXCCGCC
CCXXAGXCXGCAGCXAACGC AXAAGCA 10 20 30 40** AGCAACGCAA AGAACXXAC
CAAAXCXXGA CAXCCXXXGA CAACXCXA 10 20 30 ** CXXAAGCXXA GXXGCCAXCA
XXAAGXXGGG 1020 30 40 ** XCAAAXCAXC AXGCCXXA XGAXXXGGG XACACACGXG
CXACA 10 20 30 40 50** GXGAAXACGX XCCCGGCCXXXCXGAXXAG CGXCCCGCCA
XGCACGCGCA 60 70 80 90 100 CGAGXXXGXACACCCGAAGCCGGXGGAGX
AACXXXXAGGAGCXAGCCG 110 120 XCGAAGGXGG GACAAAXGAX (in a DNA array of any array, in X=T:RNA array, it is X=U)

[Claim 2] It is the probe for Staphylococcus-aurei (Staphylococcus aureus) detection characterized by being 15-35 which are guided from the array indicated by claim 1, DNA which has the array of 18 to 24 nucleotide, or its complementary sequence preferably, or an RNA nucleic acid probe.

[Claim 3] The Staphylococcus-aurei (Staphylococcus aureus) detection approach characterized by carrying out hybridization of the probe for Staphylococcus-aurei (Staphylococcus aureus) detection indicated by claim 1 or 2 to the nucleic acid belonging to the stock which denaturalized when required at first in the case of the duplex chain, and which should be identified, and performing alternative detection or identification.

[Translation done.]

*** NOTICES ***

JPO and NCIPD are not responsible for any damages caused by the use of this translation.

1. This document has been translated by computer. So the translation may not reflect the original precisely.
2. **** shows the word which can not be translated.
3. In the drawings, any words are not translated.

DETAILED DESCRIPTION

[Detailed Description of the Invention]

[0001]

[Industrial Application] This invention relates to the detection of *Staphylococcus aureus* in a clinical laboratory test especially the inspection concerning food poisoning, or food evaluation.

[0002]

[Description of the Prior Art] In detection of *Staphylococcus aureus*, when a specimen is a patient's vomit, feces, food, or wiping ingredient, by the time it identifies *Staphylococcus aureus*, actuation of resulting in culture pure and check culture through enrichment culture and isolation culture will be performed, but the time amount which each [these] culture time amount takes is 18 - 24 hours, and if it is made the total duration, it has also required the thing long time for about four days. Moreover, the biochemical trial in check culture is also an aerobic check, a VP reaction, reduction of a nitrate, and Tween80. It is necessary to investigate hydration, hyaluronidase, and sugar decomposition, is operationally complicated, and is an approach with many problems in respect of time amount or costs.

[0003] In order to solve the above-mentioned trouble, the DNA probe method or hybridization method which used the oligonucleotide has come to be tried. for example, Kohne[-- one approach Biochemical Journal 8:1104-1118(1968)] and others prepares the probe of a rRNA array -- arguing -- **** -- Pace and Campbell[-- Journal of Bacteriology 107 : 543-547(1971)] It is arguing about the hybridization method for quantifying extent of the homology of rRNA from a different bacteria kind, and such homology. Sogin [Journal of Molecular Evolution 1 [furthermore,] : the primary-structure property of a different ribosomal RNA molecule for phylogeny theory-related evaluation is used for 173-184(1972)] and others -- a logical and practical viewpoint -- arguing -- **** -- Fox[International Journal of Systematic Bacteriology 27 : 44-57(1977)] ** -- it is arguing about the comparison catalog method to a procaryote classification. moreover, Kohne ** -- Gen-Probe The strategy for obtaining the nucleic-acid fragment for using it as a probe to a ribosomal RNA molecule in an application patent (1983) of a shrine is described.

[0004]

[Problem(s) to be Solved by the Invention] If this invention is required when it is a double chain at the beginning used in order to detect DNA which may be used for the DNA probe method or the hybridization method which used the oligonucleotide or RNA, especially 16SrRNA gene of the *Staphylococcus-aureus* origin, it is going to offer detection method [that the *Staphylococcus aureus* at the time of inspecting the oligonucleotide probe for *Staphylococcus-aureus* detection and causative-micro-organisms-of-food-poisoning inspection, and the bacterial infection and the contamination that carries out hybridization to the complementary DNA or the RNA array belonging to the stock which denaturalized beforehand and which should identified is simple, and high sensitivity].

[0005]

[Means for Solving the Problem] this invention person etc. searched widely about DNA or RNA which may be used for the DNA probe method or hybridization method which used the oligonucleotide, succeeded in creation of the oligonucleotide hybridized on 16SrRNA gene and the selection target of *Staphylococcus aureus*, and completed this invention.

[0006] That is, this invention consists of the following three invention.

1. Invention about probe for *Staphylococcus-aurei* (*Staphylococcus aureus*) detection characterized by being DNA or RNA nucleic acid probe which has array of following ** thru/or **, or its complementary sequence.

10 20 30 40 50** XGAGXAACAC GXGGAXAAC XACCXAXAAG ACXGGGAXAA
CXXCGGGAAA 60 70 80 90 100 CCGGAGCXAA XACCGGAXAA XAXXXXGAAC CGCAXGGXXC

AAAAGXGAAA 110 120 130 140 150 GACGGXCXXG CXGXCACXXA XAGAXGGAX
 CCGCGCXGCA XXAGCXAGXX GGXA 1020 3040 50** GAGXAACACG XGGAXAAC
 ACCXAXAAGA CXGGAXAAC XXCGGGAAAC 60 70 80 90 100 CGGAGCXAAX ACCGGAXAAX
 AXXXXGAACC GCAXGGXXCA AAAGXGAAAG 110 120 130 140 CAGGXCXXCG
 XGXCACXXAX AGAXGGAXCC CGCGXCGAXX AGC 10 20 30 40 50** GGXCXXCGGA
 XCGXAAAACX CXGXXAXXAG GGAAGAACAX AXGXGXAAGX 60 70 80 AACGXGCAC
 AXCXXGACGG XACCAAXCA GAAAGC 10 20 30 40 50 ** AXGGAGGAAC ACCAGXGGCG
 AAGGGCACXX XCXGGXCXGX AACXGACGCX 10 20 30 40 ** AGXGXXAGGG GGXXXCCGCC
 CCXXAGXCXGCAGCXAACGC AXAAGCA 10 20 30 40 ** AGCAACGCAA AGAACXXAC
 CAAAXCXXGA CAXCXXXGA CAACXCXA 10 20 30 ** CXXAAGCXXA GXXGCCAXCA
 XXAAGXXGGG10 20 30 40 ** XCAAAXCAXC AXGCCXXA XGAXXXGGGC XACACACGXG
 CXACA10 20 30 40 50** GXGAAXACGX XCCCAGGCCXX XCXGAXXAG CGXCCCAGCA
 XGCACGCGCA 60 70 80 90 100 CGAGXXXGA ACACCCGAAG CCGGXGGAGX AACCXXXXAG
 GAGCXAGCCG 110 120 XCGAAGGXGG GACAAAXGAX (in a DNA array of any array, in X=T:RNA
 array, it is X=U)

2. It is invention about the probe for *Staphylococcus-aurei* (*Staphylococcus aureus*) detection characterized by being 15-35 which are guided from the array indicated by the above-mentioned invention 1, DNA which has the array of 18 to 24 nucleotide, or its complementary sequence preferably, or an RNA nucleic acid probe.

3. Invention about *Staphylococcus-aurei* (*Staphylococcus aureus*) detection approach characterized by carrying out hybridization of probe for *Staphylococcus-aurei* (*Staphylococcus aureus*) detection indicated by above-mentioned invention 1 or 2 to nucleic acid belonging to stock which denaturalized when required at first in the case of duplex chain, and which should be identified, and performing alternative detection or identification.

[0007] This invention is explained more below at a detail for an understanding of this invention. The probe in probe this invention can be acquired from *Staphylococcus-aureus* DNA or a ribosome, or can be compounded by in vitro. In order to use it effective in detection assay, the probe of 15 or more bases has the desirable die length of a probe. that to which that [the probe's] by which the indicator is carried out by the well-known approach of generally enabling those detection was desirable, and, as for the desirable DNA probe, the radiation indicator was carried out for example, using 32P grade -- or a nonradioactive indicator is given using a compound alternatively combinable with the directions matter which forms a detectable compound or detectable complex. As said complex, avidin, a biotin and an antigen, an antibody, and an enzyme and a compound like the substrate corresponding to it are mentioned. As another non-isotopic labeling, a fluorescence compound, a compound with high electron density, acridine ester, and luminescence lanthanides are mentioned.

[0008] The probe of this invention is a nucleic acid probe for using for detection and identification of a bacteria microorganism of *Staphylococcus aureus*, and is DNA which becomes accuracy from the unique array of DNA or RNA with the probe of this invention useful in order to detect and identify various bacteria kinds of *Staphylococcus aureus* specifically by which the indicator was carried out respectively preferably more, or an RNA nucleic acid probe, i.e., the specific probe of *Staphylococcus aureus*. The specific probe of the *Staphylococcus aureus* of this invention is characterized by having the array which comes to exchange X, and A C and G in the array of the array of the following ** thru/or ** or its complementary sequence, i.e., the following **, thru/or **.

10 20 30 40 50** XGAGXAACAC GXGGAXAAC XACCAAXAG ACXGGAXAA
 CXXCGGGAAA 60 70 80 90 100 CGGAGCXAAX ACCGGAXAA XAXXXGAAC CGCAXGGXXC
 AAAAGXGAAA 110 120 130 140 150 GACGGXCXXG CXGXCACXXA XAGAXGGAX
 CCGCGCXGCA XXAGCXAGXX GGXA 1020 3040 50** GAGXAACACG XGGAXAAC
 ACCXAXAAGA CXGGAXAAC XXCGGGAAAC 60 70 80 90 100 CGGAGCXAAX ACCGGAXAAX
 AXXXXGAACC GCAXGGXXCA AAAGXGAAAG 110 120 130 140 CAGGXCXXCG
 XGXCACXXAX AGAXGGAXCC CGCGXCGAXX AGC 10 20 30 40 50** GGXCXXCGGA
 XCGXAAAACX CXGXXAXXAG GGAAGAACAX AXGXGXAAGX 60 70 80 AACGXGCAC
 AXCXXGACGG XACCAAXCA GAAAGC 10 20 30 40 50 ** AXGGAGGAAC ACCAGXGGCG
 AAGGGCACXX XCXGGXCXGX AACXGACGCX 10 20 30 40 ** AGXGXXAGGG GGXXXCCGCC
 CCXXAGXCXGCAGCXAACGC AXAAGCA 10 20 30 40 ** AGCAACGCAA AGAACXXAC
 CAAAXCXXGA CAXCXXXGA CAACXCXA 10 20 30 ** CXXAAGCXXA GXXGCCAXCA
 XXAAGXXGGG10 20 30 40 ** XCAAAXCAXC AXGCCXXA XGAXXXGGGC XACACACGXG

CXACA10 20 30 40 50** GXGAAXACGX XCCCAGGCCXX XCXGAXXCAG CGXCCCGCCA
 XGCACGCGCA 60 70 80 90 100 CGAGXXXGXA ACACCCGAAG CCGGXGGAGX AACCXXXXAG
 GAGCXAGCCG 110 120 XCGAAGGXGG GACAAAXGAX (in a DNA array of any array, in X=T:RNA
 array, it is X=U)

Furthermore, 15-35 which are guided from the array indicated above as a specific probe of the Staphylococcus aureus of this invention, and the thing which has the array of 18 to 24 nucleotide or its complementary sequence preferably can be mentioned. Preferably, 15-35 which are guided from the array indicated above, and the probe with which indicator oligomer ** of 18 to 24 nucleotide consists of complementary oligomer are probes desirable for this invention, and, specifically, the following array is mentioned.

10	20	30
• CACCTATTGG ATGGATATT TGACCCATT GAAGCCC		
10	20	30
• ATGGCCTATT ATAAAACTTG GCGTACCAAG TTTT		
10	20	30
• AACGACAGTG AATATCTACC CTAGGCCGA CGT		

②の配列からるものとして：

10	20	30
• TTTCGTCCAGA AGCACAGTG AATATCTACCT AGGGCCAG		

③の配列からものとして：

10	20	30
• TTTTGAGACA ATAATCCCTT CTITGTATAACA CATTCAATT		

④の配列からものとして：

10	20	30
• TTGCGTTTCT TTGGAATCGTT TAGAACTGTA		

⑤の配列からものとして：

10	20	30
• GAATTCGAAT CAACGGTAGT AATTCAACCC		

⑥の配列からものとして：

10	20	30
• AGTACGGGGA ATACTAAACC CGATGTGTGCA		

⑦の配列からものとして：

10	20	30
• CCACCTCATT GGAAAATCCT CGATCGGCAG CTTCCAC		

** Consider as the thing from an array. :

[0009] Acquisition with a well-known present condition technique is possible for these nucleic acid probes, and they are obtained by various roots especially gene engineering, the direct manual, or automatic composition.

[0010] First, rRNA of other living things used and isolated reverse transcriptase, and acquisition of a probe, the synthetic this invention person, etc. identified as complementary a DNA array as rRNA of Staphylococcus aureus without homology. Reverse transcriptase is the approach of using RNA as mold, imprinting it and making a complementary DNA strand (cDNA), and was able to compound rRNA to cDNA of Staphylococcus aureus by using this enzyme. After identifying the DNA fragment which carries out the cord of the 16SrRNA(s) by hybridization, the nucleotide sequence of those DNA was determined by the standard approach (for example, Sanger etal, 74: 5453 (1977), and Proc.Natl.Acad.Sci). The homology region and the heterology field were determined as compared with other various rRNA arrays released to the degree in this nucleotide sequence. The DNA fragment of Staphylococcus aureus was obtained for the field without the array and homology of the others released using the formation of a subclone, or an oligonucleotide automatic synthesizer unit. The indicator of these characteristic Staphylococcus-aureus DNA fragments can be carried out using 32P or 35S, and it can be used as a probe for examining to the both sides of Staphylococcus aureus and non-Staphylococcus aureus. Moreover, if , a probe array can be included in a vector and the obtained vector can also be used as a probe. The vector used for this must not have homology in neither of the non-Staphylococcus aureus which may exist in the sample examined.

[0011] The array of a probe specific to *Staphylococcus aureus* is explained below. The array of the array numbers 1-9 in a (array table) shows the nucleotide sequence of nine parts of *Staphylococcus-aureus* 16SrRNA. This array is computer program FTgenetics (GENETYX). It uses and they are two kinds of data banks. GenBank (the U.S. Department of Health and Human Services) When it compares with the nucleic-acid array indicated by EMBL (European Molecular Biology Laboratory), it is the part in which certainly differing in the field of non-*Staphylococcus aureus* and a base some was checked.

[0012] Although the probe of this invention has the above-mentioned array, it is not limited only to them and, in addition to the array shown in the array table, also contains a probe with 15-35 which are guided from those arrays, and the array preferably constituted by the oligomer or complementary oligomer of 18 to 24 nucleotide. These probes can also be used combining two or more kinds of probes.

[0013] How to compound polynucleotide pro-BU using an oligonucleotide automatic synthesizer unit is explained below. Polynucleotide pro-BU of 37 nucleotide chain length with the following convention array was compounded by the thio phosphite method (JP,61-180002,A). When composition was completed, the polynucleotide was separated from support, the specified substance was able to be isolated preparatively by HPLC using C18 column by the known chromatography method, and the polynucleotide with about 99% of purity was able to be obtained. As compared with the standard polynucleotide of 37 bases, generation was checked for the created polynucleotide by electrophoresis.

After checking that the base sequence of the polynucleotide created by the approach of 5'-CACCTATTGG ATGGATATTC TGACCTATT GAAGCCC -3' above is right with a known dideoxy chain termination method, it investigated whether this polynucleotide would combine with 16SrRNA(s) of *Staphylococcus aureus*. First, 16SrRNA(s) were extracted from *Staphylococcus aureus* a phenol chloroform extraction and by operating ethanol precipitation etc. It checked that mixed the created probe with this, made reverse transcriptase act under alpha-35 S-dATP existence, this probe became a primer, and the cDNA expanding reaction was advancing using approaches, such as an electrophoresis method and autoradiography. It checked that created polynucleotide pro-BU checked 16SrRNA(s) made into the target, and was combinable with this result.

[0014] If these nucleic-acid arrays are required when it is a duplex chain at first, they have the property which forms the complementary DNA or the RNA array which denaturalized, and a hybrid. Incubation in a basic culture medium, the rise of culture-medium temperature, and these 2 process can combine the denaturation of a nucleic acid, or an operation of microwave can perform it again. Hybrid formation can be performed by various approaches.

[0015] The indicator of the probe of this invention is carried out to this contractor about the indicator of a nucleic acid probe by one of the well-known approaches. For example, this is also well-known, although an indicator is carried out with the radioisotope of 32P grade or an indicator is carried out with nonradioactive isotopes, such as an enzyme. In a certain case, although the indicator of the probe is not carried out with an enzyme, it is chemically embellished with the biotin which can exist for example, after hybridization.

[0016]

[Function] by forming nucleic-acid hybrid complex and detecting this complex by contacting this probe to the bacteria in a sample, under the conditions from which rRNA of all the *Staphylococcus aurei* that exist in a sample, and the hybridization of this probe become possible, the probe of this invention can detect existence of the *Staphylococcus aureus* in a sample, and is proof about existence of the *Staphylococcus aureus* in a sample -- it can shine. Especially almost all genes consist of compound mixture of rRNA[protein and RNA. In all living things, participate in translation of genetic information, and it has the multiplex copy of] to which three sorts of different ribosomal RNA molecules exist in bacteria (5S, 16S, 23S) (Noller (1984) Ann.Rev.Biochem.53: 119). Various bacterial cells are about 1.2x10⁴. Since the ribosome of an individual is included, any cell is at least 1.2x10⁴. As opposed to each rRNA of a molecule being included Since other genes in bacteria only recognize 1-2 copy existence per cell, and the mRNA product is not stable and it moreover does not always imprint, Detection of rRNA by hybridization is about 10⁴ to the hybridization to DNA of other genes. Twice sensibility will be good.

[0017]

[Example] Nine sorts of probes (SA31, SA32, SA33, SA41, SA51, SA81, SA9, SA101, and SA111) which have the array shown in the array table and the following arrays with homology were compounded by the above-mentioned thio phosphite approach, and the identification trial was performed about the Li *Staphylococcus aureus* and non-*Staphylococcus aureus* by hybridization assay.

	10	20	30	
SA31;	CA CCTATTGG	ATGGATATTG	TGACCCATT	GAAGCCC
	10	20	30	
SA32;	ATGGCCTATT	ATAAAACCTTG	GCGTACCAAG	TTTT
	10	20	30	
SA33;	AACGACAGTG	AATATCTACC	CTAGGCCGGA	CGT
	10	20	30	
SA41;	TTCGTCCAGA	AGCACAGTGA	ATATCTACCT	AGGGCGCAG
	10	20	30	
SA51;	TTTGAGACA	ATAATCCCTT	CTTGTATACA	CATTCA
	10	20	30	
SA81;	TTGCGTTCT	TGGAATGGTT	TAGAACTGTA	
	10	20	30	
SA9;	GAATTCGAAT	CAACGGTAGT	AATTCAACCC	
	10	20	30	
SA101;	AGTACGGGGA	ATACTAAACC	CGATGTGTGCA	
	10	20	30	
SA111;	CCACCTCATT	GGAAAATCCT	CGATCGGCAG	CTTCCAC
	10	20		

The result of a trial was shown in Table 1. As shown in Table 1, the specific thing was shown in *Staphylococcus aureus* and the inside SA31, SA32, SA33, SA41, SA51, SA9, and SA111 of these probes hardly performed hybridization with DNA of the non-*Staphylococcus-aureus* origin, or RNA. However, some pseudopositeness was seen about SA81 and SA101. In addition, the non-*Staphylococcus aureus* shown in Table 1 is a part of the strains which can serve as a subject of examination in *Staphylococcus-aureus* inspection.

[0018]

[Table 1]

表1 細菌類の検出

	プローブ								
	SA31	SA32	SA33	SA41	SA51	SA81	SA9	SA101	SA111
黄色ブドウ球菌	+	+	+	±	+	±	+	+	+
黄色ブドウ球菌 TSS-1	+	+	±	+	+	+	+	+	+
大腸菌	-	-	-	-	-	±	±	±	±
カンピロバクター、コリ	-	-	-	-	-	-	-	±	-
カンピロバクター、シエジュニ47	-	-	-	-	-	-	-	±	-
カンピロバクター、シエジュニ48	-	-	-	-	-	-	-	±	-
サルモネラ	-	-	-	-	-	±	±	±	-
リストリア	-	-	±	-	±	±	±	+	±
緑膿菌	-	-	-	-	-	-	-	-	-

[0019]

[Effect] Detection of the *Staphylococcus aureus* using the probe of this invention gives a quick and exact result, is the laboratory of clinical or food and can investigate the existence of the *Staphylococcus aureus* in a sample to the inside of a short time. Moreover, since it depends for the detection approach of this invention on the bacterial nucleic-acid content instead of a biological property with much other various fluctuation, not only a typical kind but a non-type-kind is biologically [*Staphylococcus aureus*] detectable, and further, since the cell to which this detection approach not necessarily survives in detection is not needed, the need for the transport medium for transportation of a sample to a laboratory does so the outstanding effectiveness of removing.

[0020]

[Layout Table] array number: -- die-length [of one array]: -- mold [of 154 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- single strand topology: -- class [of straight chain-like array]: -- 16SrRNA array
 XGAGXAACAC GXGGAXAACC XACCXAXAAG ACXGGGAXAA CXXCGGGAAA
 CCGGAGCXAA 60XACCGGAXAA XAXXXXGAAC CGCAXGGXXC AAAAGXGAAA
 GACGGXCXXG CXGXCACXXA 120 XAGAXGGGAX CCGCGCXGCA XXAGCXAGXX GGXA 154
 array number: -- die-length [of two arrays]: -- mold [of 143 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -
 - single strand topology: -- class [of straight chain-like array]: -- 16SrRNA array GAGXAACACG
 XGGAXAACCX ACCXAXAAGA CXGGGAXAAC XCXGGGAAAC CGGAGCXAAX 60
 ACCGGAXAAX XXXXXGAACC GCAXGGXXCA AAAGXGAAAG CAGGXCCXXCG
 XGXCACXXAX 120 AGAXGGAXCC CGCGXCGAXX AGC 143 array number: -- die-length [of three arrays]: -- mold [of 86 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- single strand topology: -- class [of straight chain-like array]: -- 16SrRNA array GGXCXXCGGA XCGXAAAACX CXGXXAXXAG
 GGAAGAACAX AXGXGXAAAGX AACGXGCAC 60 AXCXXGACGG XACCAAXCA GAAAGC
 86 array number: -- die-length [of four arrays]: -- mold [of 50 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- single strand topology: -- class [of straight chain-like array]: -- 16SrRNA array
 AXGGAGGAAC ACCAGXGGCG AAGGGCACXX XCXGGCXGX AACXGACGX 50 array
 number: -- die-length [of five arrays]: -- mold [of 48 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- single strand topology: -- class [of straight chain-like array]: -- 16SrRNA array AGXGXXAGGG

GGXXXCCGCC CCXXAGXCXG CAGCXAACGC AXXAAGCA 48 array number: -- die-length [of six arrays]: -- mold [of 48 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- single strand topology: -- class [of straight chain-like array]: -- 16SrRNA array AGCAACGCAA AGAACCCXXAC CAAAXCXXGA
CAXCCXXXGA CAACXCXA 48 array number: -- die-length [of seven arrays]: -- mold [of 30 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- single strand topology: -- class [of straight chain-like array]: -- 16SrRNA array CXXAAGCXXA GXXGCCAXCA XXAAGXXGGG 30 array number: -- die-length [of eight arrays]: -- mold [of 45 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- single strand topology: -- class [of straight chain-like array]: -- 16SrRNA array XCAAAXCAXC AXGCCXXA XGAXXXGGC
XACACACGXG CXACA 45 array number: -- die-length [of nine arrays]: -- mold [of 120 arrays]: -- number [of nucleic-acid chains]: -- single strand topology: -- class [of straight chain-like array]: -- 16SrRNA array GXGAAXACGX XCCC GGCCXX XCXGAXXCAG CGXCCC GCCA XGCAC GCGCA
CGAGXXXGXA 60 ACACCCGAAG CCGGXGGAGX AACC XXXXAG GAGCXAGCCG
XCGAAGGXGG GACAAAAGAX 120

[Translation done.]

(19)日本国特許庁 (JP)

(12) 公開特許公報 (A)

(11)特許出願公開番号

特開平6-90798

(43)公開日 平成6年(1994)4月5日

(51)Int.Cl.⁵
C 12 Q 1/68
// C 12 Q 1/68
C 12 R 1:445

識別記号 庁内整理番号
ZNA A 7823-4B

F I

技術表示箇所

8931-4B C 12 N 15/ 00

A

審査請求 未請求 請求項の数3(全8頁)

(21)出願番号 特願平4-54232

(22)出願日 平成4年(1992)2月5日

(71)出願人 000003034

東亞合成化学工業株式会社

東京都港区西新橋1丁目14番1号

(72)発明者 林 貴子

愛知県名古屋市港区船見町1番地の1 東亞
合成化学工業株式会社名古屋総合研究所内

(72)発明者 吉田 ▲祇▼生

茨城県つくば市大久保2番東亞合成化学工
業株式会社つくば研究所内

(72)発明者 寺田 建司

愛知県名古屋市港区船見町1番地の1 東亞
合成化学工業株式会社名古屋総合研究所内

(54)【発明の名称】 黄色ブドウ球菌検出用プローブ及び検出方法

(57)【要約】

【目的】臨床検査、事に食中毒にかかる検査、あるいは
食品検査における、黄色ブドウ球菌類(Staphylococcus aureus)の検出を迅速かつ正確に行うこととする
ものである。

【構成】特定配列を有するDNA又はRNA核酸プローブからなる黄色ブドウ球菌類(Staphylococcus aureus)
検出用プローブ及び該プローブを用いる黄色ブドウ球菌類(Staphylococcus aureus)検出方法。

【効果】黄色ブドウ球菌類(Staphylococcus aureus)
の検出が迅速かつ正確に行えるほか、標本の輸送のため
の輸送培地の必要性もない。

1

2

【特許請求の範囲】

【請求項1】 下記①乃至⑨の配列又はその相補的配列を有するDNA又はRNA核酸プローブであることを*

	10	20	30	40	50
①	XGAGXAACAC	QXGGAXAACC	XACGXAXAAG	ACKGGAXAA	CXXCGGAAA
	60	70	80	90	100
	CCCGAGCXA	XACCGGAXAA	XAXXXGAAC	CCCAXGGXXC	AAAAGXGAAA
	110	120	130	140	150
	GACGGXOXXG	CXQXCAOXAA	XAGAXGGAX	CCGGCGXGCA	XXAGGXAGXX
	GGXA				
	10	20	30	40	50
②	GAQXAACACG	XGGAXAACXX	ACGXAXAAGA	CXGGGAXAAC	XXCCGGAAAC
	60	70	80	90	100
	CCGAGCXAAX	ACCGGAXAXX	AXXXXGAACC	GCAXGGXXCA	AAAAGXGAAAG
	110	120	130	140	
	CAGGXOXXCG	XQXCACXXAX	AGAXGGAXCC	CCGQXCGAXX	ACC
	10	20	30	40	50
③	CGQXXXCGGA	XCGXAAAACX	CXQXXAXXAG	GGAAGAACAX	AXQGXAAQX
	60	70	80		
	AAQGXGAC	AXQXXGACGG	XACXXAAXCA	GAAACC	
	10	20	30	40	50
④	AXGGAGGAAC	ACCAQXGGCG	AAGGGCAOX	XCGQXQXQX	AAQXGACGQX
	10	20	30	40	
⑤	AGQXXXAGG	CGXXXXCCCC	CCXXAQXCG	CAGQXACCC	AXXAAGCA
	10	20	30	40	
⑥	AGCAACGCAA	AGAACCOXXAC	CAAAXQXXGA	CAXCQXXXGA	CAAQXCA
	10	20	30		
⑦	CXXAACXXA	QXXGCCAXCA	XXAAQXXGGG		
	10	20	30	40	
⑧	XCAAAXCAXC	AXCCCCCOXXA	XGAXXXGGCC	XACACACQXG	CXACA
	10	20	30	40	50
⑨	QXGAAXACGX	XCCCGGCOXX	XQXGAXXCG	CGXCCCCCA	XGCACGGCCA
	60	70	80	90	100
	CCAGQXXXOA	ACACCCGAAG	CCGGXGGAGX	AACQXXXAG	GAGQXAGCCG
	110	120			
	XCGAAGQXGG	GACAAAXGAX			

(いずれの配列もDNA配列の場合 X = T : RNA配列の場合 X = U)

【請求項2】 請求項1に記載された配列から誘導される15~35、好ましくは18~24ヌクレオチドの配列又はその相補的配列を有するDNA又はRNA核酸プローブであることを特徴とする黄色ブドウ球菌類(*Staphylococcus aureus*)検出用プローブ。

【請求項3】 請求項1又は2に記載された黄色ブドウ球菌類(*Staphylococcus aureus*)検出用プローブを、最初二重鎖の場合に必要であれば変性した同定されるべき株に属する核酸とハイブリッド形成させて選択的検出又は同定を行うことを特徴とする黄色ブドウ球菌類(*Staphylococcus aureus*)検出方法。

【発明の詳細な説明】

* 特徴とする黄色ブドウ球菌類(*Staphylococcus aureus*)検出用プローブ。

【0001】

【産業上の利用分野】本発明は、臨床検査、特に食中毒にかかる検査、あるいは食品検査における、黄色ブドウ球菌の検出に関するものである。

【0002】

【従来の技術】黄色ブドウ球菌の検出において、検査材料が患者の嘔吐物、糞便、食品または拭き取り材料の場合、黄色ブドウ球菌と同定するまでには、増菌培養、分離培養を経て純培養、確認培養にいたる操作を行っているが、それら各培養時間に要する時間は、18~24時間であり、総所要時間にすると、約4日間もの長時間を也要している。又、確認培養における生化学的試験も、好気的確認、VP反応、硝酸塩の還元、Tween80の水解、ヒアルロニダーゼ、糖分解を調べる必要があり、操

作的に煩雑で時間や費用の点で問題の多い方法である。【0003】上記の問題点を解決するために、オリゴヌクレオチドを用いたDNAプローブ法あるいはハイブリダイゼーション法が試みられるようになってきた。例えば、Kohne[Biochemical Journal 8 : 1104-1118(1968)]らは、rRNA配列のプローブを調製する1つの方法について議論しており、PaceおよびCampbell[Journal of Bacteriology 107 : 543-547(1971)]は、異なった細菌種からのrRNAの相同性及びこれらの相同性の程度を定量化するためのハイブリダイゼーション法について議論している。更に、Sogin[Journal of Molecular Evolution 1 : 173-184(1972)]らは、系統発生論関係の評価のために異なったリボソームRNA分子の一次構造特性を用いる論理的および実際的観点について議論しており、Fox[International Journal of Systematic Bacteriology 27 : 44-57(1977)]らは、原核生物分類への比較カタログ法について議論している。又、Kohneらは、Gen-Probe社の出願特許(1983)中で、リボソームRNA分子に対するプローブとして使用するための核酸断片を得るために戦略について述べている。

【0004】

【発明が解決しようとする課題】本発明は、オリゴヌクレオチドを用いたDNAプローブ法あるいはハイブリダ*

* イゼーション法に使用され得るDNA又はRNA、特に黄色ブドウ球菌由来の16S rRNA遺伝子を検出するために用いられる、最初2重鎖である場合に必要であれば、予め変性された同定されるべき株に属する相補的DNAまたはRNA配列とハイブリッド形成する黄色ブドウ球菌検出用オリゴヌクレオチドプローブ及び食中毒菌検査、細菌感染や汚染を検査する際の黄色ブドウ球菌の簡便且つ高感度な検査法を提供しようとするものである。

10 【0005】

【課題を解決するための手段】本発明者等は、オリゴヌクレオチドを用いたDNAプローブ法あるいはハイブリダイゼーション法に使用され得るDNA又はRNAについて広く探し、黄色ブドウ球菌の16S rRNA遺伝子と選択的にハイブリダイズするオリゴヌクレオチドの作成に成功し本発明を完成させたのである。

【0006】即ち、本発明は以下の3発明からなるものである。

1. 下記①乃至⑨の配列又はその相補的配列を有するDNA又はRNA核酸プローブであることを特徴とする黄色ブドウ球菌類(Staphylococcus aureus)検出用プローブに関する発明。
- 20 2. 下記①乃至⑨の配列又はその相補的配列を有するDNA又はRNA核酸プローブであることを特徴とする黄色ブドウ球菌類(Staphylococcus aureus)検出用プローブに関する発明。

	10	20	30	40	50
①	XGAGXAACAC	GXGGAXAACCC	XACGXAXAAG	AOXGGGAXAA	CXXCGGGAAA
	60	70	80	90	100
	CCGGAGCXAA	XACCGGAXAA	XAXXXXGAAC	CCCAAXGGXXC	AAAAGXGAAA
	110	120	130	140	150
	GACGGXOXXG	OXQXAOXXA	XAGAXGGGAX	CCCGGCGXCCA	XXAGGXAGXX
	CGXAA				
②	GAQXAACACG	XGGAXAACCC	ACGXAXAAGA	CXGGGAXAAC	XXCCGGAAAC
	60	70	80	90	100
	CGGAGCXAAAX	ACCCGAXAAX	AXXXXGAACC	GCAXGGXXCA	AAAQXGAAAG
	110	120	130	140	
	CACGXOXXCG	XQXCAOXXA	AGAXGGAXCC	CCCQXCGAXX	ACC
	10	20	30	40	50
③	GGXOXXCGGA	XCGXAAAACX	CXGXAXXAG	GGAAGAACAX	AXGXGXAAQX
	60	70	80		
	AAQXGXGAC	AXOOXGACCG	XACGXAAAXCA	GAAAGC	
	10	20	30	40	50
④	AXGGAGGAAC	ACCAQXGGCG	AAGGGCAOXX	XOXGQXCGX	AAQXGACCCX
	10	20	30	40	
⑤	AQXGXAXAGG	GQXXXCCGCC	COXQXGXCG	CACGXAAACGC	AXXAAGCA
	10	20	30	40	
⑥	AGCAACCGAA	AGAACCOXXAC	CAAAXOOXGA	CAXCQXXXGA	CAAQXOA
	10	20	30		
⑦	QXXAACGXXA	QXXGCCAXCA	XXAAQXXGGG		
	10	20	30	40	
⑧	XCAAAXCAXC	AXGCCCOXXA	XGAXXXXGGG	XACACACGCG	CXACA

5

6

⑤ 10 20 30 40 50
 GXGAAXACGX XCCCCGGCOXX XOXGAXXAG CQXCCCCGCCA XGCACGGCGA
 60 70 80 90 100
 CGAQXXXGXA ACACCCGAAG CCCGAXGGAGX AACXXXXAG GAGGXAGCCG
 110 120
 XCGAAGGXGG GACAAAXGAX

(いずれの配列もDNA配列の場合 X = T : RNA配列の場合 X = U)

2. 上記発明1に記載された配列から誘導される15~35、好ましくは18~24ヌクレオチドの配列又はその相補的配列を有するDNA又はRNA核酸プローブであることを特徴とする黄色ブドウ球菌類(Staphylococcus aureus)検出用プローブに関する発明。

3. 上記発明1又は2に記載された黄色ブドウ球菌類(Staphylococcus aureus)検出用プローブを、最初二重鎖の場合に必要であれば変性した同定されるべき株に属する核酸とハイブリッド形成させて選択的検出又は同定を行うことを特徴とする黄色ブドウ球菌類(Staphylococcus aureus)検出方法に関する発明。

【0007】本発明の理解のために以下に本発明をより詳細に説明する。

プローブ

本発明におけるプローブは、黄色ブドウ球菌DNA或いはリボソームから取得するか、あるいはin vitroで合成することが出来る。検出アッセイに有効に使用するためには、プローブの長さが15塩基以上のプローブが好ましい。プローブは一般的にそれらの検出を可能にする公*

* 知の方針により標識されているものが好ましく、好ましいDNAプローブは、例えば³²P等を用いて放射線標識がされたものとか、あるいは検出可能な化合物又は複合体を形成する指示物質に選択的に結合することのできる化合物を用いて非放射性標識を施されたものである。前記複合体としては、アビシンとビオチン、抗原と抗体、及び酵素とそれに応答する基質の様な化合物が挙げられる。別の非同位体標識としては、蛍光化合物、電子密度の高い化合物、アクリジンエステル類及び発光ランタニド類が挙げられる。

【0008】本発明のプローブは、黄色ブドウ球菌の細菌微生物の検出及び同定に用いるための核酸プローブであり、より正確には、本発明のプローブは、黄色ブドウ球菌の様々な細菌種を特異的に検出及び同定するために有用な、各々好ましくは標識されたDNAまたはRNAの特異配列からなるDNAまたはRNA核酸プローブ、即ち、黄色ブドウ球菌の特異的プローブである。本発明の黄色ブドウ球菌の特異的プローブは、下記①乃至⑥の配列又はその相補的配列、即ち下記①乃至⑥の配列においてXとAをCとGを交換してなる配列を有することを特徴とするものである。

①	10 20 30 40 50	XGAGXAACAC GXGGAXAACCC XACGXAXAAG ACXGGGAXAA CXXCGGGAAA
	60 70 80 90 100	CCCGACGXAA XACCGGAXAA XAXXXGAAC CGCAAXGGXC AAAAGXGAAAG
	110 120 130 140 150	GACGGXCOXXG CXGXCAOXXA XAGAXGGGAX CCAGCCGCGCA XXAGCXAGXX CGXA
②	10 20 30 40 50	GAQXAACACG XGGAXAACX ACCXAXAAGA CXGGGAXAAC XXCCGGAAAC
	60 70 80 90 100	CGGAGGXAAAC ACCGGAXAAAX AXXXXGAACC GCAXGGXXCA AAAAGXGAAAG
	110 120 130 140	CAGGXXCG CQXCAAXXAG AGAXGGAXCC CGCGXCGAXX AGC
③	10 20 30 40 50	GGXCOXXCGA XCQXAAAACX CXQXXAXXAG GGAAGAACAX AXQXGAAGX
	60 70 80	AAQXGXCAC AXCOXGACGG XACQXAXCA GAAAGC
④	10 20 30 40 50	AXGGAGGAAC ACCAGXGGCG AAGGGCACXX XQXGGXXQX AACXGACGQX
⑤	10 20 30 40	AGXGXAXAGG GQXXXCCGCC COXQXQXG CAGQXACCC AXXAAGCA
⑥	10 20 30 40	AGCAACGCCA AGAACQXXAC CAAAXQXGA CAXCOXXGA CAAQXCA

7

8

	10	20	30		
⑦	CXXAGCXXA	CXXGCCAXCA	XXAACXXGGG		
	10	20	30	40	
⑧	XCAAAXCAXC	AXGCCCOXA	XGAXXXGGCC	XACACACGXG	CXACA
	10	20	30	40	50
⑨	GXAAXACGX	XCCCGCCOX	XOXAAXCAG	CXCCCCGCCA	XGCACGGCGA
	60	70	80	90	100
	CGAOXXXGA	ACACCCGAAG	CCGAXGGAG	AACXXXXAG	GAGOXAGCCC
	110	120			
	XCGAAGGXGG	GACAAAXGAX			

(いづれの配列もDNA配列の場合 X = T : RNA配列の場合 X = U)

更に、本発明の黄色ブドウ球菌の特異的プローブとして、上記に記載された配列から誘導される15～35、好ましくは18～24ヌクレオチドの配列又はその相補的配列を有するものを挙げることができる。上記に記載された配列から誘導される15～35、好ましくは18～24ヌクレオチドの標識オリゴマー又は相補的オリゴマーから構成されるプローブは、本発明にとり好ましいプローブであり、具体的には、下記の配列が挙げられる。

①の配列からのものとして：

10	20	30	
• CACCTATTGG ATGGATATTTC TGACCTATT GAAGCCC			
10	20	30	
• ATGGCCTATT ATAAAACCTTG GCGTACCAAG TTTT			
10	20	30	
• AACGACACTG AATATCTACC CTAGGCGCGA CGT			

②の配列からのものとして：

10	20	30	
• TTCTCCAGA AGCACAGTGA ATATCTACCT AGGGCGCAG			

③の配列からのものとして：

10	20	30	
• TTTGAGACA ATAATCCCTT CTTGTATACA CATTCAATT			

④の配列からのものとして：

10	20	30	
• TTGCGTTCT TGGAATGGTT TAGAACTGTA			

⑤の配列からのものとして：

10	20	30	
• GAATTCCAAT CAACGGTAGT AATTCAACCC			

⑥の配列からのものとして：

10	20	30	
• AGTACGGGGA ATACTAAACC CGATGTGTGCA			

⑦の配列からのものとして：

10	20	30	
• CCACCTCATT GGAAAATCCT CGATGGCAG CTTCCAC			

【0009】これらの核酸プローブは周知の現状技術で取得可能なものであって、様々なルート、特に遺伝子工学又は直接的マニュアル、もしくは自動合成によって得られる。

【0010】プローブの取得と合成

本発明者等は、まず、他の生物のrRNAとは相同性を持たない黄色ブドウ球菌のrRNAと相補的なDNA配列を、逆転写酵素を使用して、単離し同定した。逆転写酵素はRNAを録型として使い、それを転写して相補的なDNA鎖(cDNA)を作る方法であり、この酵素を用いることにより、黄色ブドウ球菌のrRNAからcDNAを合成することが出来た。ハイブリッド形成により16S rRNAをコードするDNAフラグメントを同定した後、それらのDNAのヌクレオチド配列を標準的方法(例えばSanger et al., 74: 5453 (1977), Proc.Natl.Acad.Sci.)により決定した。このヌクレオチド配列を、次に、公表されている他の種々のrRNA配列と比較し、相同性領域及び非相同性領域を決定した。公表されている他の配列と相同性の無い領域をサブクローニング又はオリゴヌクレオチド自動合成装置を用いて黄色ブドウ球菌のDNAフラグメントを得た。これらの特徴的な黄色ブドウ球菌DNAフラグメントを³²Pもしくは³⁵Sを用いて標識し、黄色ブドウ球菌及び非黄色ブドウ球菌の双方に対して試験するためのプローブとして使用することが出来る。又、必要なら、プローブ配列をベクターに組み込み、得られたベクターをプローブとして用いることも出来る。これに使用するベクターは、試験される試料中に存在する可能性のある非黄色ブドウ球菌のいづれにも相同性を有してはならない。

【0011】黄色ブドウ球菌に特異的なプローブの配列について以下に説明する。(配列表)における配列番号1～9の配列は、黄色ブドウ球菌16S rRNAの9部分のヌクレオチド配列を示している。この配列はコンピュータープログラム・ジェネティックス(GENETYX)を用いて、2種類のデータバンクGenBank(the U.S. Department of Health and Human Services)とEMBL(European Molecular Biology Laboratory)に記載されている核酸配列と比較した際、非黄色ブドウ球菌と塩基数個の領域で確実に異なることが確認された部分である。

【0012】本発明のプローブは、上記配列を有するものであるが、それだけに限定されるものではなく、配列表に示した配列に加え、それらの配列から誘導される15～35、好ましくは18～24ヌクレオチドのオリゴマーまたは相補的オリゴマーにより構成される配列を

持つプローブをも含むものである。これらのプローブは、2種類以上のプローブを組み合わせて使用することもできる。

【0013】オリゴスクレオチド自動合成装置を用いてポリスクレオチドプローブを合成する方法を以下に説明する。下記の規定配列を持つ37ヌクレオチド鎖長のポリスクレオチドプローブをチオホスファイト法(特開昭61-180002)によって合成した。合成が完了したら、ポリスクレオチドを担体から分離し、既知のクロマトグラフィー法によるC₁₈カラムを用いたHPLCによって目的物を分取し、約99%の純度を持つポリスクレオチドを得ることが出来た。作成したポリスクレオチドを、電気泳動で37塩基の標準ポリスクレオチドと比較し生成を確認した。

5'-CACCTATTGG ATGGATATTC TGACCCATT GAAGCCC - 3'
上記の方法によって作成したポリスクレオチドの塩基配列が正しいことを、既知のジデオキシ法によって確認した後、このポリスクレオチドが黄色ブドウ球菌の16S rRNAに結合するかどうかを調べた。まず、黄色ブドウ球菌から16S rRNAを、フェノール・クロロホルム抽出や、エタノール沈殿などの操作を行なうことによって抽出した。これと、作成したプローブを混合し、α-³²S-dATP存在下で逆転写酵素を作用させ、このプローブがプライマーとなってcDNA伸長反応が進行していたことを、電気泳動法及びオートラジオグラフィーなどの方法を用いて確認した。この結果により、作成したポリスクレオチドプローブは、標的としている16S rRNAを確認し、結合できることを確認した。

【0014】これらの核酸配列は、最初二重鎖である場合に必要であれば、変性された相補的DNAまたはRNA配列とハイブリッドを形成する性質を有している。核酸の変性は、塩基性培地中のインキュベート、培地温度の上昇、これら2プロセスの組合せまたは再度マイクロ波の作用によって行なうことが出来る。ハイブリッドの形成は、様々な方法によって行なうことが出来る。

【0015】本発明のプローブは、核酸プローブの標識に関して当業者に公知の方法の一つによって標識される。例えば³²P等の放射性同位元素で標識されるか、または酵素などの非放射性同位元素で標識されるが、これも公知である。あるケースでは、プローブは酵素で標識されないが、但し例えばハイブリッド形成後に存在可能なビオチンで化学的に修飾される。

【0016】

【作用】本発明のプローブは、該プローブが試料中に存在するあらゆる黄色ブドウ球菌のrRNAとハイブリッド形成可能となる条件下で、該プローブを試料中の細菌と接触させることにより、核酸ハイブリッド複合体を形成し、該複合体を検出することにより、試料中の黄色ブドウ球菌の存在を検出することができ、試料中の黄色ブドウ球菌の存在を証拠だてることができる。特に、ほと

んどの遺伝子は、rRNA〔タンパク質とRNAの複合混合物からなり、すべての生物において遺伝情報の翻訳に関与するものであり、細菌には3種の異なったリボソームRNA分子が存在する(5S, 16S, 23S)〕の多重コピーを有し(Noller(1984) Ann.Rev.Biochem. 53: 119)、各種細菌細胞は約1.2×10¹個のリボソームを含むため、いずれの細胞も少なくとも1.2×10¹分子の各rRNAを含むのに対し、細菌中の他の遺伝子は1細胞あたり1~2コピー存在するだけであり、しかも、そのmRNA産物は安定ではなく、常に転写されているわけではないため、ハイブリッド形成によるrRNAの検出は、他の遺伝子のDNAに対するハイブリッド形成に対して約10¹倍感度がよいことになる。

【0017】

【実施例】配列表に示した配列と相同性を持つ以下の配列を有する9種のプローブ(SA31, SA32, SA33, SA41, SA51, SA81, SA9, SA101, SA111)を上記チオホスファイト方法で合成し、ハイブリッド形成アッセイにより黄色ブドウ球菌及び非黄色ブドウ球菌について同定試験をおこなった。

	10	20	30
SA31; CACCTATTGG ATGGATATTC TGACCCATT GAAGCCC	10	20	30
SA32; ATGGCCTATT ATAAAACCTTG GCGTACCAAG TTTT	10	20	30
SA33; AACGACAGTG AATATCTACC CTAGGCGCGA CGT	10	20	30
SA41; TTGCGTCCAGA AGCACAGTGA ATATCTACCT AGGGCCAG	10	20	30
SA51; TTTTGAGACA ATAATCCCTT CTTGTATACA CATTCTATT	10	20	30
SA81; TTGCGTTCT TGGAATGGTT TAGAACTGTGA	10	20	30
SA9; GAATTCTGAAT CAACGGTAGT AATTCAACCC	10	20	30
SA101; AGTACGGGGA ATACTAAACC CGATGTGTGCA	10	20	30
SA111; CCACCTCATC CGAAAATCCT CGATCGGCAG CTTCCAC	10	20	

40 試験の結果を表1に示した。表1に示すように、これらのプローブのうちSA31, SA32, SA33, SA41, SA51, SA9, SA111は黄色ブドウ球菌に特異的であることが示され、非黄色ブドウ球菌由来のDNAあるいはRNAとはほとんどハイブリッド形成を行なわなかった。しかしSA81, SA101については若干の擬陽性がみられた。なお、表1に示した非黄色ブドウ球菌は、黄色ブドウ球菌検査において、検査対象となり得る菌種のうちの一部である。

【0018】

【表1】

11
表1 細菌類の検出

12

	プローブ									
	SA31	SA32	SA33	SA41	SA51	SA81	SA9	SA101	SA111	
黄色ブドウ球菌	+	+	+	±	+	±	+	+	+	+
黄色ブドウ球菌 TSS-1	+	+	±	+	+	+	+	+	+	+
大腸菌	-	-	-	-	-	-	±	±	±	±
カンピロバクター・コリ	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-
カンピロバクター・シエジニ47	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-
カンピロバクター・シエジニ48	-	-	-	-	-	-	-	-	±	-
サルモネラ	-	-	-	-	-	±	±	±	-	-
リストリア	-	-	±	-	±	±	±	+	±	-
緑膿菌	-	-	-	-	-	-	-	-	-	-

【0019】

【効果】本発明のプローブを用いた黄色ブドウ球菌の検出は、迅速かつ正確な結果を与え、臨床や食品の検査室で、短時間のうちに標本中の黄色ブドウ球菌の有無を調べることが出来る。又、本発明の検出方法は、他の様々な変動の多い生物学的性質ではなく細菌の核酸含量に依存するため、黄色ブドウ球菌の生物学的に典型的な種のみならず、非典型的な種も検出可能であり、更に、本検出方法は検出に必ずしも生存している細胞を必要としな*

*いため、検査室への標本の輸送のための輸送培地の必要性が除かれるという優れた効果を奏するものである。

【0020】

【配列表】配列番号：1

配列の長さ：154

配列の型：核酸

鎖の数：一本鎖

トポロジー：直鎖状

配列の種類：16S rRNA

配列

XGAGXAACAC	GXGGAXAACC	XACOXAXAAG	ACXGGGAXAA	OXCGGGAAA	CCGGACGXAA	60
XACCGGAXAA	XAXXXXGAAC	CCGAXGGXXC	AAAAGXGAAA	GACGGXOXXG	OXGXCAOXXA	120
XAGAXGGGAX	CCCCCOXGCA	XXAGCXAGXX	GXA			154

配列番号：2

※鎖の数：一本鎖

配列の長さ：143

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

※40 配列の種類：16S rRNA

配列

GAGXAACACG	XGGAXAACCX	ACCOXAXAAGA	CXGGAXAAC	XXCCGGAAAC	CGGAGGXAA	60
ACCCGAXAAX	AXXXXGAACC	GCAXGXXCA	AAACGXAAAG	CAGGXOXXG	XGXCAOXXA	120
AGAXGGAXCC	CGCGXCGAXX	AGC				143

配列番号：3

★鎖の数：一本鎖

配列の長さ：86

トポロジー：直鎖状

配列の型：核酸

★ 配列の種類：16S rRNA

配列

CGXOOXCGGA	XCGXAAAACX	CXGXAXXAG	GGAAGAACAX	AXGXGXAAQX	AAAGGXGCAC	60
AXOOGACGG	XACOXAXC	AAAGC				86

配列番号：4

配列の長さ：50

配列の型：核酸

配列

AXGGAGGAAC ACCAQXGGCG AAGGGCACXX XOXGQXGXAAQXGACGCCX 50

* 鎮の数：一本鎮

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：16S r RNA

配列番号：5

配列の長さ：48

配列の型：核酸

配列

AQXQXXAGGC GQXXXCCGCC COXXAGXCG CAGCXAACGC AXAAAGCA 48

★ 鎮の数：一本鎮

トポロジー：直鎖状

★ 配列の種類：16S r RNA

配列番号：6

配列の長さ：48

配列の型：核酸

配列

AGCAACCAA AGAACOXXAC CAAAXCXXGA CAXCXXXGA CAACXOA 48

☆ 鎮の数：一本鎮

トポロジー：直鎖状

☆ 配列の種類：16S r RNA

配列番号：7

配列の長さ：30

配列の型：核酸

配列

OXXAAGOXXA QXXGCCAXCA XXAAGQXGGG 30

◆ 鎮の数：一本鎮

トポロジー：直鎖状

◆ 配列の種類：16S r RNA

配列番号：8

配列の長さ：45

配列の型：核酸

配列

XCAAAXCAXC AXGCCCOXXA XGAXXXGGCC XACACACQXG CXACA 45

* 鎮の数：一本鎮

トポロジー：直鎖状

* 配列の種類：16S r RNA

配列番号：9

配列の長さ：120

配列の型：核酸

配列

QXGAAXACGX XCCCCGGCXX XCXGAXXGAG CGXCCCGCCA XCCACGGCGA CGAGXXXGXA 60

ACACCCGAAG CGGQXGGAGX AACXXXXAG GAGOXAGCCG XCGAAGQXGG CACAAAXGAX 120